

PENGARUH PEMBERIAN JUS MENGKUDU TERHADAP *REACTIVE OXYGEN INTERMEDIATE* (ROI) MAKROFAG *BRONCHOALVEOLAR* TIKUS YANG TERPAJAN ASAP ROKOK

Herlisa Anggraini*, Neni Susilaningsih, Pudjadi****

* *Magister Ilmu Biomedik Universitas Diponegoro*

E-mail: lilis_anggra@yahoo.co.id Telp.08122553342

***Fakultas Kedokteran Undip/ Magister Ilmu Biomedik Universitas Diponegoro*

ABSTRAK

Tujuan penelitian untuk membuktikan adanya perbedaan ROI dengan menganalisis perbedaan produksi ROI makrofag *bronchoalveolar* pada tikus yang terpajan asap rokok dengan dan tanpa pemberian jus mengkudu. Mengkudu diketahui memiliki kandungan antioksidan yang dapat berperan menurunkan oksidan. Penelitian dilakukan secara eksperimental laboratorik dengan rancangan *the post test only-control group* menggunakan 20 ekor tikus wistar terbagi dalam 4 kelompok secara random yang dipajan asap rokok 2x/hari. Kelompok kontrol: tidak diberi perlakuan. Kelompok P1, P2, P3 masing-masing diberi jus mengkudu (*TNJ/tahitian noni juice*) dengan dosis P1=1 mL/hari, P2=2 mL/hari, P3=4 mL/hari, selama 30 hari. Adapun index jumlah ROI dihitung dari supernatan kultur makrofag *bronchoalveolar* yang distimulasi dengan larutan PMA dan dioksidasi dengan larutan NBT dan larutan *Neutral Red* menjadi presipitat formazan yang hasilnya dibaca di bawah mikroskop cahaya dengan diukur prosentase dan derajatnya. Hasil index jumlah ROI dianalisis menggunakan uji *Shapiro Wilks*, dilanjutkan analisis nonparametrik *Kruskal Wallis* ($p=0.135$). Adanya variasi jumlah jus mengkudu (*TNJ/tahitian noni juice*) yang diberikan pada tikus yang terpajan asap rokok pada penelitian ini, belum dapat menunjukkan parameter sebagai antioksidan yang dapat mengurangi oksidan dari pajanan asap rokok.

Kata kunci: *Jus mengkudu (TNJ/tahitian noni juice), Asap Rokok, ROI*

PENDAHULUAN

Merokok diestimasikan 90% menyebabkan kanker paru – paru pada pria, dan sekitar 70% pada wanita. Indonesia menduduki peringkat ke-4 jumlah perokok terbanyak di dunia dengan jumlah sekitar 141 juta orang. Konsumsi rokok Indonesia setiap tahun diperkirakan mencapai 199 miliar batang rokok, berakibat pada kematian sebanyak 5 juta orang pertahunnya. Bila hal ini tidak dapat dicegah, maka jumlah kematian akan meningkat dua kali mendekati 10 juta orang pertahun pada tahun 2020 (Gondodiputro S, 2007).

Asap rokok mengandung molekul radikal bebas sebanyak 10^{16} molekul per satu hisapan, berbagai bahan kimia, tar, asbestosi, H_2O_2 dan lainnya (Suhartono E, Fachir H, Setiawan B, 2007). Asap rokok dapat menghilangkan antioksidan intraseluler dalam sel paru-paru dengan mengaktifkan makrofag alveolus untuk melepaskan *leuketrin* B-4, IL-8 (*interleukin*-8) dan TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*) (Muhammad I, 2009; Diken H, et al., 2001; Drath DB, 1979; Rima A, dkk., 2007). Makrofag juga dapat dipicu oleh opsonin dan protein kinase C untuk sekresi ROI. Substansi ini merupakan mediator kunci inflamasi makrofag, dimana makrofag yang teraktivasi dikarakteristikan dengan peningkatan sekresi ROI (Roit I, et al., 2001).

Studi pada tikus secara *in vitro* menunjukkan asap rokok umumnya dapat memulai terjadinya kerusakan oksidatif yang dapat dihalangi oleh senyawa antioksidan yang terdapat dalam tumbuhan (Chow CK, 1993; Purboyo A, 2009). Salah satu tumbuhan yang dapat berfungsi sebagai antioksidan adalah *Morinda citrifolia* L (mengkudu atau noni). Berbagai penelitian menunjukkan bahwa mengkudu mengandung vitamin C yang dapat menjaga serangan oksidasi secara eksogenus dan endogenus pada cairan ekstra seluler paru (Hidajat B, 2005.; Djauhariya E, Rosman R, 2000), serta selenium yang bersama vitamin C dapat menurunkan aktivasi faktor kappa-beta yang memiliki peranan dapat meningkatkan proses peradangan oleh sitokin (<http://digilib.unsri.ac.id/download/selenium>. 2011; Hidajat B. 2005), dan flavonoid yang dapat mengurangi aktivitas radikal hidroksi, anion superoksida, dan radikal peroksida (Waji RA, Sugrani A, Flavonoid, 2009.; <http://www.damandiri.or.id>, 2001).

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis perbedaan produksi ROI makrofag *bronchoalveolar* pada tikus yang terpajan asap rokok dengan dan tanpa pemberian jus mengkudu.

METODE PENELITIAN

Sampel Penelitian. Sampel penelitian menggunakan makrofag *bronchoalveolar* dari tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diberi jus mengkudu (TNJ/tahitian noni juice) dengan dosis P1=1 mL/ hari; P2= 2 mL/ hari; P3= 4 mL/ hari melalui sonde, dengan kelompok kontrol tikus tanpa pemberian jus mengkudu. Satu kelompok perlakuan terdiri dari 5 ekor yang diberi pajanan asap rokok kretek dua kali dalam sehari selama 30 hari, dilaksanakan di Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Negeri

Semarang setelah mendapatkan persetujuan *ethical clearance* dari Komisi Etika Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro-RSUP Dr Kariadi Semarang, sedangkan tempat analisa ROI makrofag *bronchoalveolar* dilaksanakan di Laboratorium Cebior Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.

Dekapitasi hewan coba dan pengambilan cairan *bronchoalveolar*. Tikus wistar diterminasi dengan dekapitasi leher, dan seluruh permukaan leher sampai ventral disiram dengan alkohol 70%. Dibuat irisan kecil melalui sayatan ventral, selanjutnya kulit dirobek hingga terkelupas, dan tampak rongga pleura. Trakhea yang terlihat dihubungkan dengan kanula dengan tabung polietilen yang terhubung dengan jarum suntik, kemudian paru-paru dicuci dengan 3 mL larutan PBS beberapa kali hingga didapatkan cairan *bronchoalveolar* dalam jumlah yang cukup.

Isolasi makrofag tikus. Cairan *bronchoalveolar* disentrifus dengan kecepatan 2500g selama 10 menit pada suhu 20°C, suspensi sel ditambah dengan 2 mL PBS dan dilakukan pencucian 2 kali, kemudian ditambah 1 mL medium komplet RPMI 1640 dan FBS 10%, selanjutnya dihitung dengan *hemocytometer* dengan kepadatan 5×10^5 sel/ml selama 2 jam inkubator CO₂ pada suhu 37°C. Sel dicuci dengan larutan HBSS dan ditambahkan medium komplet RPMI 1640, kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C selama 24 jam.

Pengukuran produksi ROI makrofag. Suspensi makrofag *bronchoalveolar* yang telah dihitung dikultur pada *microplate* yang diberi *coverslip* bulat, selanjutnya ditambah medium komplet RPMI 1640 dan FBS 10% serta dicuci dengan RPMI, dilakukan inkubasi dalam inkubator CO₂ 5 % pada suhu 37°C dilakukan berulang kali. Tiap sumuran ditambahkan 500 uL larutan NBT, serta dilakukan pencucian dengan PBS sebanyak 3x, dan difiksasi dengan metanol absolut selama 30 detik. Pewarnaan menggunakan larutan *Neutral Red* 2 %, kemudian *coverslip dimounting* pada gelas benda dengan *canada balsam*. Produksi ROI diukur prosentase dan derajatnya berdasarkan pada presentasi terbentuknya presipitat dihitung dengan *scoring* 1-4, dengan kriteria : derajat 1 : presipitat <25%, derajat 2 : presipitat 25-50% , derajat 3 : presipitat 50-75%, derajat 4 : presipitat >75%. Perhitungan index produksi ROI makrofag dibaca pada 50 sel dan dihitung berdasarkan jumlah sel yang ada dikalikan derajat masing-masing (Dietert RR, et al., 1995)

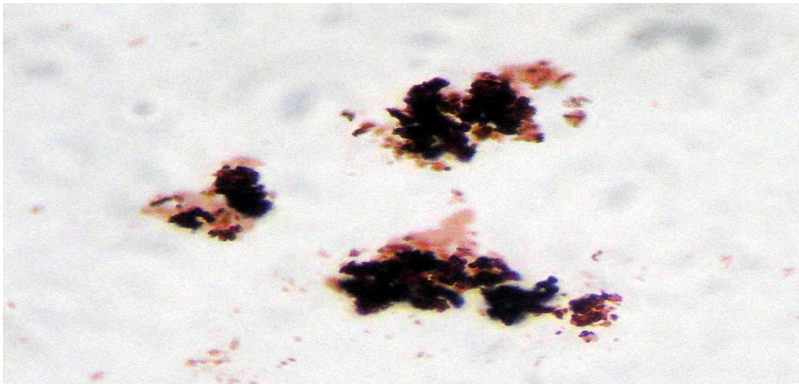
Analisa data. Analisis deskriptif index produksi ROI makrofag menggunakan uji *Shapiro Wilks*, dilanjutkan analisis nonparametrik *Kruskal Wallis*.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Hasil pemeriksaan produksi ROI makrofag *bronchoalveolar* berdasarkan kelompok ditampilkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Analisis Index Produksi ROI makrofag *bronchoalveolar*

Kelompok	N	Rata-rata	SD	Minimum	Maksimum
Kontrol	5	2,76	0,270	2,5	3,1
P1	5	2,62	0,130	2,5	2,8
P2	5	2,90	0,122	2,8	3,1
P3	5	2,72	0,164	2,5	2,9



Gambar 1. Foto Produksi ROI Makrofag *Bronchoalveolar*

Untuk mengetahui normalitas ROI dilakukan uji *Shapiro-Wilk* ($p=0,083$), kemudian dilakukan analisis uji homogenitas varians($p=0,019$), dilanjutkan uji nonparametrik *Kruskal Wallis* ($p=0,135$), menunjukkan tidak terdapat perbedaan produksi ROI makrofag *bronchoalveolar* pada tikus yang dipajan asap rokok dengan dan tanpa pemberian jus mengkudu (*TNJ*).

Hasil penelitian pengukuran produksi ROI makrofag *bronchoalveolar* ini belum dapat membuktikan secara signifikan penggunaan jus mengkudu (*TNJ*) dari tumbuhan *Morinda citrifolia* L sebagai salah satu tumbuhan yang mengandung senyawa antioksidan untuk mengurangi kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh pajanan asap rokok. Meskipun pada penelitian yang dilakukan oleh Wang *et al*, membuktikan adanya aktivitas antioksidan dalam *TNJ*, Palu *et al* juga membuktikan bahwa jus mengkudu (*TNJ*) dapat mengaktifkan *cell* B2 reseptor, menghambat *cell* B1 reseptor, dan menekan produksi IL-4 (*interleukin-4*) yang sebenarnya dapat mengurangi respon alergi dan inflamasi pada saluran pernafasan, namun pada penelitian lain Palu *et al* menyatakan bahwa *TNJ* dapat meningkatkan produksi IF- γ (*interferon-gamma*) yang berperan dalam mengaktifkan makrofag, sehingga memungkinkan produksi ROI makrofag tidak dapat ditekan secara maksimal. Hal ini disebabkan adanya adaptasi metabolik, seperti akumulasi vitamin E di paru-paru, dan peningkatan aktivitas superoksida dismutase dalam makrofag alveolar dan jaringan paru pada tikus yang terpajan asap rokok yang memungkinkan tikus tersebut melawan stres oksidatif dan menolak kerusakan lebih lanjut, sehingga tidak dapat

merangsang makrofag alveolar. Akibat kurangnya rangsangan pada makrofag maka sel paru-paru tidak banyak kehilangan antioksidan intraseluler dan tidak ada pengaktifan makrofag alveolus untuk melepaskan *leukotrien B4*, *IL-8 (interleukin-8)* dan *TNF- α (tumor necrosis factor- α)*, sedangkan peningkatan sekresi ROI dikarakteristikan berdasar teraktivasinya makrofag.

SIMPULAN

Penelitian dengan melakukan pengukuran produksi ROI makrofag *bronchoalveolar* pada tikus wistar yang terpajan asap rokok dengan dan tanpa pemberian jus mengkudu (*TNJ*) pada dosis 1mL/hari, 2mL/hari maupun 4 mL/hari, belum dapat membuktikan secara signifikan penggunaan jus mengkudu (*TNJ*) sebagai antioksidan yang dapat mengurangi kerusakan oksidatif akibat pajanan asap rokok.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan Nasional Republik Indonesia yang telah memberikan dana BPPS untuk studi lanjut dan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Chow CK. 1993. Cigarette smoking and oxidative damage in the lung. *Ann N Y Acad Sci.* 686:289-98.
- Dietert RR, Hotchkiss JH, Austic RE, Sung Y. 1995. Production of Reactive Nitrogen Intermediates by Macrophages. In: *Methodes in Immunotoxicology*. editor : Burleson GR, Dean JH, Munson AE. New York. A John Wilye Liss & sons Inc Publ. 2:99-1117.
- Diken H, Kelle M, Tomer C, Denuz B, Baylan Y, Permet A. 2001. Effects of Cigarette Smoking on Blood Antioxidant Status in Short-Term and Long-Term Smokers. *Turk J Med Sci.* (31):553-557.
- Djauhariya E, Rosman R. Status Perkembangan Teknologi Tanaman Mengkudu. http://balittro.litbangdepan.go.id/ind/images/stories/edsus/vol_19_no_1/2000. Diunduh tanggal 25 Agustus 2011
- Drath DB, Karnovsky ML, Huber GL. 1979. Tobacco smoke. Effects on pulmonary host defense inflammation. *USA.* 3(3):281-8
- Gondodiputro S. 2007. Bahaya tembakau dan bentuk-bentuk sediaan tembakau. *Bagian Ilmu Kesehatan Masyarakat Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran.* Bandung. 1-2, 9-112.
- Hidajat B. 2005. Penggunaan Antioksidan Pada Anak. *Continuing Education XXXV. Hot Topics in Pediatr.* Surabaya. 3-4 September: 1-10. <http://www.damandiri.or.id/file/muhammadsamsiipbbab5.pdf>. Diunduh tanggal 23 Agustus 2011
- Muhammad I. 2009. Efek Antioksidan Vitamin C Terhadap Tikus (*Rattus norvegicus* L) Jantan Akibat Paparan Asap Rokok. Tesis. Bandung.
- Palu AK, Kim AH, West BJ, Deng S, Jensen J, White L. 2008. The effects of *Morinda citrifolia* L(noni) on the immune system: Its molecular mechanisms of action. *J Ethnopharmacol.* 115(3):502-6.
- Purboyo A. 2009. Efek Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) pada kelinci yang dibebani glukosa. Tesis. Surakarta.
- Rima A, Suradi, Surjanto E, dan Yunus F. 2007. Korelasi Antara Jumlah Makrofag, Neutrofil Dan Kadar Enzim Matrix Metalloproteinase (MMP)-9 Pada Cairan Kurasan Bronkial

- Perokok. Surakarta. J Respir Indo. 27 (3): 3.
- Roit I, Brostoff J, Male D. 2001. Immunology. 6 ed. Toronto; Mosby Elsevier Science Limited. 1-13.
- Selenium <http://digilib.unsri.ac.id/download/selenium.pdf>. Diunduh tanggal 25 Agustus 2011;
- Suhartono E, Fachir H, Setiawan B. 2007. Rokok sebagai sumber radikal bebas dalam Kapita selekta biokimia: Stres oksidatif dasar & penyakit. Banjarmasin. Pustaka Banua. 117-8.
- Waji RA, Sugrani A. 2009. Flavonoid. Unhas. Makasar. 1-24.
- Wang MY, West BJ, Jensen J, Diane N, Chen SU, Palu AK, et al. 2002. *Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in Noni research Acta Pharmacol. USA. 23(12):1127-41.